製品コード 6136

研究用

TaKaRa

cDNA Library Construction Kit

説明書

v201308Da

目次

I. 製品説明

真核生物の様々な組織や細胞より調製した polyA+ RNA から cDNA を合成し、クローニングを行う操作は、分子生物学的研究における重要な手法の一つとして、頻繁に実施されています。また、この技術により遺伝子の構造解析や目的のタンパク質を発現させる操作が容易に行えるようになりました。
一般的に、cDNA 合成とそのライブラリーは、目的の polyA+ RNA に相補的な二本鎖 cDNA を合成してバクテリアやウイルス由来のベクターに組み込んだ後、この組換えベクターをバクテリアあるいは真核細胞に導入し複製して cDNA を増幅させ、cDNA の解析を行うためや、更に *in vitro* transcription や *in vitro* translation 等を行うために利用されます。
cDNA Library Construction Kit は、主に動植物由来の polyA+ RNA より二本鎖 cDNA を合成し、プラスミドベクターへ組み込むことにより cDNA ライブラリーを構築するためのキットです。本キットで使用しているベクター pAP3neo は SV40 プロモーターを有し、哺乳動物細胞での発現が可能です（VIII. 補足資料参照）。
本キットでの cDNA ライブラリーの構築には、Gubler-Hoffman の方法 [1)] に基づいたリンカープライマー法 [2)] を使用しており、遺伝子の方向性を維持する Directional cloning が可能となっています。
システムの原理を次ページ図 1 に示します。

1）PrimeScript RTase と Oligo (dT)$_{18}$ Anchor Primer [1, 3-5)] を用いて 1st Strand cDNA を合成する。1st Strand cDNA 合成時には 5-methyl dCTP を使用する。
2）*E. coli* RNase H [6)] で、mRNA-1st Strand cDNA ハイブリッド中の RNA にニックを入れて、*E. coli* DNA Polymerase I と *E. coli* DNA Ligase のシステムにより、RNA 鎖を DNA 鎖に置き換えていき、2nd Strand cDNA を合成する。[1, 7)]
3）T4 DNA Polymerase により、末端の平滑化を行う。
4）アダプターをライゲーション後、*Not* I にて消化を行う。
5）スピンカラムにより短鎖 DNA を除去する。
6）ベクター pAP3neo [8)] とのライゲーション反応を行う。（Directional cloning）
7）エレクトロポレーションにより大腸菌へ導入する。
8）タイターおよびインサート分布を確認する。

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

V $(T)_{18}$ _ *Not* I _ $(AG)_{10}$

PrimeScript RTase による 1st 鎖合成
（Oligo $(dT)_{18}$ Anchor Primer ＊および 5-methyl dCTP 使用）
＊：本プライマーには *Not* I サイトに加え、*Xho* I サイトも付加されている。

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

V $(T)_{18}$ _ *Not* I _ $(AG)_{10}$

M M M

M：methyl-dCTP

DNA Polymerase I および *E. coli* RNaseH/DNA Ligase Mixture による 2nd 鎖合成
末端構造の平滑化（T4 DNA polymerase）

AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGGCCGC _ $(TC)_{10}$
TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCCGGCG _ $(AG)_{10}$

M M M

*Eco*R I Adaptor のライゲーション（T4 DNA Ligase）

*Eco*R I M M M *Eco*R I

Not I による消化
スピンカラムによる短鎖 DNA の除去

*Eco*R I M M M *Not* I

*Eco*R I-*Not* I 切断ベクター
（pAP3neo Predigested Vector）などとライゲーション

エレクトロコンピテントセルを形質転換
（*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells, *E. coli* HST02 Electro-Cells, Stellar™ Electrocompetent Cells など）

cDNA ライブラリー

図 1．本キットを用いた cDNA ライブラリー構築の流れ

II. キットの内容（5 回構築分）

1.	PrimeScript RTase（200 U/μl）	5 μl
2.	RNase Inhibitor（40 U/μl）	5 μl
3.	Oligo (dT)18 Anchor Primer（1 μg/μl）＊1	10 μl
4.	5 × 1st Strand Synthesis Buffer ＊2	20 μl
5.	1st Strand dNTP Mixture	6 μl
6.	*E. coli* RNase H/*E. coli* DNA Ligase Mixture	10 μl
7.	*E. coli* DNA Polymerase I（20 U/μl）	10 μl
8.	2nd Strand dNTP Mixture	23 μl
9.	5 × 2nd Strand Synthesis Buffer ＊2	150 μl
10.	T4 DNA Polymerase（1 U/μl）	20 μl
11.	10 × T4 DNA Ligase Buffer	20 μl
12.	T4 DNA Ligase（350 U/μl）	20 μl
13.	*Eco*R I-*Sma* I Adaptor（0.4 μg/μl）	18 μl
14.	*Not* I Supplement	135 μl
15.	*Not* I（50 U/μl）	15 μl
16.	tRNA（10 μg/μl）	5 μl
17.	Dr. GenTLE Precipitation Carrier ＊3	60 μl（4℃保存）
18.	3M Sodium Acetate（pH5.2）	1 ml（4℃保存）
19.	pAP3neo Predigested Vector（100 ng/μl）＊4	5 μl
20.	RNase-free H_2O	640 μl
21.	Control RNA（1 μg/μl）＊5	5 μl
22.	T7 promoter primer ＊6（5 pmol/μl）	20 μl
23.	T3 promoter primer（for pAP3neo）＊6（5 pmol/μl）	20 μl
スピンカラム	（CHROMA SPIN™-1000+DEPC-H_2O Columns ＊7）	5 本（4℃保存）

＊1： Oligo (dT)18 Anchor Primer には、*Not* I サイトの他に *Xho* I サイトも付加されています（VIII. 補足資料参照）。*Not* I ではなく *Xho* I 消化を行うことで、*Eco*R I-*Xho* I フラグメントとして二本鎖 cDNA を調製することも可能ですので、これらのサイトを利用したベクター（脱リン酸化されたものは不可）での cDNA ライブラリー構築にも使用できます。なお、本キットには *Xho* I 消化用の酵素などは含まれていませんので、別途用意してください。また、アダプターライゲーション後に *Xho* I 消化を行う場合には、VIII. 補足資料 3 の注意事項をご確認ください。

＊2： PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit（製品コード 6111A）に含まれるものとは組成が異なります。

＊3： Gen とるくんエタ沈キャリア（製品コード 9094）と同じものです。

＊4： *Eco*R I、*Not* I で切断済みです。

＊5： 本キットに添付されている Control RNA は、SP6 promoter 領域の下流に pBR322 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約 1.4 kb の断片を挿入したプラスミド pSP Tet3 を鋳型にして、SP6 RNA Polymerase を用いて *in vitro* transcription により合成したものです。本キットには 1 反応分（5 μg）の Control RNA が含まれます。

なお、Control RNA は、30 個のアデニン塩基よりなる polyA+ tail を持つ鎖長約 1.4 kb の polyA+ RNA で、この RNA を鋳型に二本鎖 cDNA を合成して、適当なプラスミドに挿入した際、二本鎖 cDNA が full-length のものであれば、プラスミドはテトラサイクリン耐性になります。

＊6： インサートチェックおよびシーケンスに使用可能です。配列情報は、巻末の補足資料を参照。

＊7： Clontech Laboratories 社の製品です。（下蓋を別添付）

（注） 本製品には形質転換（エレクトロポレーション法）に必要な大腸菌は含まれておりません。本製品の使用には、メチル化 DNA による形質転換が可能な大腸菌のエレクトロコンピテントセルが必要です。*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells（製品コード 9028）、Clontech 社の Stellar™ Electrocompetent Cells（製品コード 636765）などを別途ご用意ください。

キット以外に必要な試薬、器具類

＜試薬＞
エレクトロポレーション用コンピテントセル：
E. coli HST08 Premium Electro-Cells（製品コード 9028）
Stellar™ Electrocompetent Cells（製品コード 636765、Clontech 社）など
フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1, v/v/v）
クロロホルム／イソアミルアルコール（24：1, v/v）
エタノール
TE バッファー（10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH8.0）
DNA サイズマーカー
1%アガロースゲル（0.1 μg/ml エチジウムブロマイド含有）
LB 培地
LB/Amp (100 μg/ml) プレート

＜器具＞
微量遠心機（マイクロ遠心機）
恒温水槽（次の各温度設定で使用；温度によっては、サーマルサイクラーも可）；
8℃、12℃、16℃、37℃、42℃、70℃
マイクロピペット
マイクロ遠心チューブ
ピペットチップ
FALCON チューブ（BD 社 Code No.352059）
エレクトロポレーション装置・器具類一式
電気泳動装置一式

III. 保存

● [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、[18] 3M Sodium Acetate（pH5.2）、
スピンカラム：4℃
● その他キット内試薬類：－ 20℃

IV. cDNA 合成反応を行う前の準備、注意点

1. 器具類の滅菌法

市販の滅菌ディスポーサブルプラスチック器具類は通常 RNase フリーと考えてよく、そのまま実験に用いてもさしつかえありませんが、マイクロ遠心チューブやマイクロピペット用チップなどはオートクレーブ処理を行った後用いてください。ガラス器具、スパーテルなどを用いる場合には、160℃で少なくとも 2 時間以上乾熱滅菌を行ってください。乾熱滅菌できないものは、0.1%ジエチルピロカーボネート（DEPC）溶液で 37℃、12 時間処理した後、オートクレーブ処理を行ってから（DEPC による RNA のカルボキシメチル化を防ぐ）用いてください。

RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておくことが必要です。また、RNase が混入する最も大きな要因は、素手からの持ち込みなので、RNA を用いた実験を行う際には必ずプラスチック手袋とマスクを着用してください。

2. 試薬類の調製法

試薬類は可能な限り 0.1% DEPC 溶液で処理し、オートクレーブにかけてから使用します。オートクレーブできない試薬が含まれている場合には、あらかじめ滅菌操作を行った器具類、水などを用いて溶液を調製した後、ろ過滅菌の操作を行ってからご使用ください。
用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

3. RNA サンプルの調製

純度の高い RNA を調製する必要があります。多糖や蛋白質などの不純物が RNA に混入していると cDNA 合成反応が阻害される可能性があります。また DNA も逆転写酵素の鋳型となり得ますのでゲノム DNA の混入も防ぐ必要があります。組織や細胞からの RNA 調製は、できるだけ早く行ってください。不可能な時は、使用するまで－ 80℃の冷凍庫もしくは液体窒素中で保存してください。

（1） 全 RNA の調製

塩化セシウム密度勾配遠心法やチオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法（AGPC 法）、あるいは市販の RNA 分離精製用の試薬、キットを用います。

RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）

NucleoSpin® RNA（製品コード 740955.10/.50./250）

（2） polyA$^+$ RNA の精製

polyA$^+$ RNA は Oligo (dT) Cellulose あるいは Poly (U) Sepharose を用いて、全 RNA から単離する方法が一般的です。*Oligotex™ -dT30 <Super>*、*Oligotex™ -dT30 <Super>* mRNA Purification Kit を用いると高純度の polyA$^+$ RNA を容易に回収できます。

（3） RNA の純度検定

最大限の cDNA 合成活性を得るためには、出来るだけ純度の高いインタクトな polyA$^+$ RNA サンプルを得ることが重要です。cDNA 合成反応を行う前には、RNA の純度検定を行うことを推奨します。

1） アガロースゲル電気泳動による検定（全 RNA）

全 RNA 1 ～ 2 μg を熱変性（65℃ , 10 分）し、アガロースゲルを用いて電気泳動します。分解の起こっていない真核細胞の全 RNA では 2 本の ribosomal RNA（28S と 18S）のはっきりとしたバンドがおよそ 2：1 の割合でみられますが、ribosomal RNA のバンドが拡散している場合は、RNase が混入している可能性がありますので使用しないでください。

また、28S のバンドよりも分子量の大きいバンドがある場合は、ゲノム DNA の混入が考えられますので Recombinant DNase I（RNase-free）（製品コード 2270A/B）による処理を行ってから cDNA 合成反応に用いてください。

この検定はアジレント 2100 バイオアナライザおよび Agilent RNA6000 Nano LabChip キットを用いるとより正確に行えます。

2） 吸光度による検定（全 RNA および polyA$^+$ RNA）

吸光度を測定し、A_{260}/A_{280} の比率が 1.7 以下のサンプルは使用しない方が望ましく、比率が 1.8 ～ 2.1 のサンプルを使用することをお勧めします。

V. プロトコール

V-1. 1st Strand cDNA 合成反応

1）マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を調製する。

[3]	Oligo(dT)$_{18}$ Anchor Primer＊	2 μl
[5]	1 st Strand dNTP Mixture	1.2 μl
	鋳型 RNA（polyA^{+} RNA）	5 μg
[20]	RNase-free H_2O	up to 10 μl

2) 65℃で 5 分間加熱後、氷上で急冷する。
3) 以下の反応液を加え、全量を 20 μl にする。

	上記鋳型 RNA/Primer mixture	10 μl
[4]	5 × 1 st Strand Synthesis Buffer	4 μl
[2]	RNase Inhibitor	1 μl
[1]	PrimeScript RTase	1 μl
[20]	RNase-free H_2O	4 μl

4) 穏やかにピペッティングで混合する。
5）42℃で 1 時間保温する。
6）氷中に移し、2 分間冷却する。

＊： 本プライマーには *Not* I サイトに加え、*Xho* I サイトも付加されています。

V-2. 2nd Strand cDNA 合成反応および末端の平滑化

1） 1st Strand cDNA 合成反応後の反応液 20 μl を含んだマイクロ遠心チューブに以下の反応液を加えて、全量を 146 μl とする。

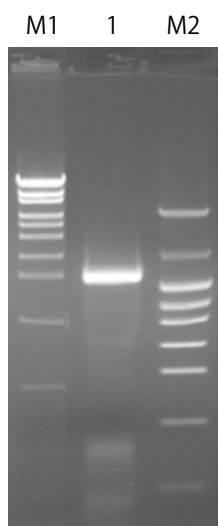
[9]	5 × 2nd Strand Synthesis Buffer	30 μl
[8]	2nd Strand dNTP Mixture	4.5 μl
[20]	RNase-free H_2O	87.5 μl
[6]	*E. coli* RNase H / *E. coli* DNA Ligase Mixture	2 μl
[7]	*E. coli* DNA Polymerase I	2 μl

2） 穏やかにピペッティングで混合し、16℃で 2 時間保温する。
3） 70℃で 10 分間保温後、室温で 5 分間放置する。
4） [10] T4 DNA Polymerase 4 μl を加え、穏やかにピペッティングする。
5） 37℃で 10 分間保温する。
6） 2nd Strand cDNA 合成反応後の反応液＊ 150 μl にフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）150 μl を加え、ボルテックスミキサーで 5 〜 10 秒間混合する。
7） 室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。（中間層を取らないように注意する。）
8） クロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）を 150 μl 加え、ボルテックスミキサーで 5 〜 10 秒間混合する。
9） 室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。
10） 上清に 1/10 量の [18] 3M Sodium Acetate（pH5.2）、[17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier 4 μl、2 〜 2.5 倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
11） 直ちに室温で 15,000 rpm、30 分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
12）70%エタノールで沈殿をリンスする。
13） 風乾後、沈殿を 12.5 μl の [20] RNase-free H_2O に溶解する。

＊：使用する polyA+ RNA が不純物を含む、分解が疑われる場合は、2nd 鎖合成後、一部を電気泳動し cDNA の伸長や合成量を確認してください。
これらの polyA+ RNA を使用すると cDNA の合成および伸長に影響が出る場合があります。通常、電気泳動パターンはスメアになりますが、cDNA の合成が確認されない場合や低分子へのシフトが確認される場合は、より高純度の RNA サンプルより再度 cDNA を合成することをお勧めします。

（参考）コントロール反応実施例

プロトコールに従って、コントロール RNA（約 1.4 kb）5 μg を鋳型に、Oligo (dT)18 Anchor Primer を用いて 2nd Strand cDNA 合成反応まで行った。
反応液をフェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製し、一部を電気泳動に用いた。

M1　1　M2

Lane
1：　2nd Strand cDNA 合成産物
M1：　λ-*Eco*T14 I digest
M2：　pHY Marker

（結果）
2nd Strand cDNA 合成で二本鎖の cDNA のバンドが確認できた。

V-3.　アダプターのライゲーション

1）上記 cDNA 溶液 12.5 μl に以下の反応液を加えて、全量を 20 μl とする。

[11]	10 × T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
[13]	*Eco*R I-*Sma* I Adapter	3.5 μl
[12]	T4 DNA Ligase	2 μl

2）ピペッティングで穏やかに混合し、8℃で一晩以上保温する。
3）70℃で 30 分間保温し、更に 5 分間室温に放置する。

V-4.　制限酵素 *Not* I による消化

1）アダプターライゲーション溶液 20 μl に以下の反応液を加え、全量を 50 μl とする。

[14]	*Not* I Supplement	27 μl
[15]	*Not* I	3 μl

2）ピペッティングで穏やかに混合し、37℃で 3 時間保温する。

V-5. スピンカラムによる短鎖 DNA の除去

以下のカラム処理は、400 bp 以下の短鎖 DNA を除去するために行います。

A. スピンカラムの準備＊[1]

1） カラム内のゲルを反転により均一に再懸濁する。
2） カラム下部の末端部分を折って取り除き、次に上蓋を取り外す。上蓋および下蓋（別添付）は捨てないように注意する。
3） カラム内のバッファーを自然流出させる（溶出には約 10 分を要する）。
4） 下蓋を装着し、1 ml の TE バッファーを加える。さらに上蓋を装着し、反転によりカラム内のゲルを均一に再懸濁する。
5） 上蓋を取り外した後、下蓋をゆっくり取り外す。上蓋および下蓋は捨てないように注意する。
6） A-3) ～ A-4) の操作を再度繰り返す。
7） 上蓋および下蓋を取り外し、カラム内のバッファーを自然流出させる。
8） 排出液回収用に予め蓋を除去した 1.5 ml チューブを FALCON チューブに設置し、その中にピンセットを用いて静かにカラムをセットする＊[2]。
9） スウィングロータータイプの遠心機で 700×*g*、5 分間遠心する。
10）新しく蓋を除去した 1.5 ml チューブを FALCON チューブに設置し、カラムをセットする。

＊1：スピンカラムの準備は、*Not* I 消化中に行うことをお勧めします。ただし、ゲル表面の乾燥には注意する必要があります。
＊2：カラムのゲル内に気泡が入った場合は、下蓋を装着し再度 TE を添加後、上蓋を取り付けゲルを反転により再懸濁し、上記 A-7) に進んでください。

B. 短鎖 DNA の除去

1） *Not* I 消化溶液 50 μl に以下の反応液を加えて混合する。

TE バッファー	40 μl
[16] tRNA	1 μl

2） B-1) で調製した溶液を A で準備したカラム内のゲル表面中央部に 10 μl ずつ数回に分けてゆっくり添加する。
3） スウィングロータータイプの遠心機で 700×*g*、5 分間遠心する。
4） カラム溶出液約 100 μl ＊を新しい 1.5 ml チューブに移す。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）100 μl を加え、ボルテックスミキサーで 5 ～ 10 秒間混合する。
5） 室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。（中間層を取らないように注意する。）
6） クロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）を 100 μl 加え、ボルテックスミキサーで 5 ～ 10 秒間混合する。
7） 室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。
8） 上清に 1/10 量の [18] 3M Sodium Acetate（pH5.2）、[17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier 4 μl、2 ～ 2.5 倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
9） 直ちに室温で 15,000 rpm、30 分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
10）70%エタノールで沈殿をリンスする。
11）風乾後、沈殿を 15 μl の [20] RNase-free H_2O に溶解する。

＊：溶出液が 100 μl に満たない場合、TE を添加することも可能です。

V-6. ベクターライゲーション

1） 以下の反応液を調製し、ベクターとのライゲーション反応を行う。

[11] 10 × T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
Purified cDNA	15 μl
[19] pAP3neo Predigested Vector	1 μl
[12] T4 DNA Ligase	2 μl

2） ピペッティングで穏やかに混合し、12℃で一晩保温する。
3） ライゲーション反応液に TE バッファーを 80 μl 加え、更にフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）100 μl を添加後、ボルテックスミキサーで 5 〜 10 秒間混合する。
4） 室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。（中間層を取らないように注意する。）
5） クロロホルム／イソアミルアルコール（24:1）を 100 μl 加え、ボルテックスミキサーで 5 〜 10 秒間混合する。
6） 室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。
7） 上清に 1/10 量の [18] 3M Sodium Acetate（pH5.2）、[17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier 4 μl、2 〜 2.5 倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
8） 直ちに室温で 15,000 rpm、30 分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
9） 70%エタノールで沈殿をリンスする。
10） 風乾後、沈殿を 20 μl の TE バッファーに溶解する。
11） − 20℃で保存する。

V-7. トランスフォーメーション

1） Stellar™ Electrocompetent Cellsを－ 70℃から出し氷上で溶かす。
2） 氷上で冷やしておいた滅菌済マイクロチューブにライゲーション溶液の一部（0.5 ～ 1.0 μl）を取り、大腸菌（40 μl）を加え、ピペッティングでゆっくりと混合する。
3） 速やかに氷上で冷やしておいた0.1 cmキュベットに移し、電圧パルスを加える。

エレクトロポレーション実施例＊1

ライゲーション溶液：0.5 ～ 1.0 μl　　機種：Gene Pulser II（Bio-Rad社）
宿主大腸菌：Stellar™ Electrocompetent Cells　　パルス条件：1.5 kV, 200 Ω, 25 μF
（パルス条件はご使用のエレクトロポレーターの取扱説明書もご参照ください。）

4） すばやくSOC（960 μl）をキュベットに加え、全量を回収する。
5） 培養用チューブ（FALCONチューブなど）に移し、37℃にて1時間振とう培養する。
6） 5) の一部（1 μlおよび10 μl相当）をLB/Ampプレートにプレーティングする。残りの培養液は4℃で保存する。＊2
7） 37℃で一晩培養する。
8） コロニー数をカウントし、プライマリーライブラリーのタイターを求める。
9） [22] T7 promoter primerおよび[23] T3 promoter primer（for pAP3neo）にてコロニーPCRを行い＊3、インサート分布を確認する。PCRによる検出が難しい場合は、制限酵素を用いてインサートの分布を確認する。

＊1：cDNAインサートはメチル化されていますので、形質転換される場合には、*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells（製品コード9028）、Stellar™ Electrocompetent Cells（製品コード636765）など、メチル化DNAによる形質転換が可能な大腸菌をご利用ください。また、エレクトロポレーション法を行う際には、大腸菌50 μlあたり4 μl以下のライゲーション液を目安に形質転換を行ってください。
＊2：4℃での一晩保存は問題ありませんが、それ以上長期の4℃保存はお勧めしません。
＊3：コロニーPCR条件の例（10 μl反応系）

TaKaRa LA Taq HS	0.1 μl	（0.5 U）
各Primer	0.5 μl	（各2.5 pmol）

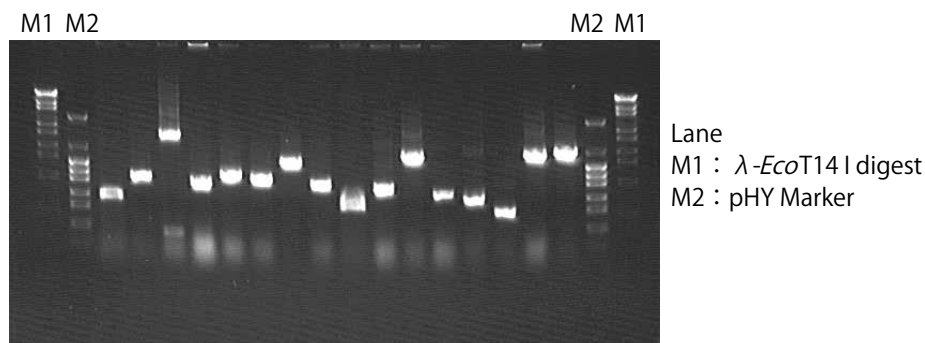
本キットには40反応分のプライマーが入っています。不足する場合はVIII. 補足資料のプライマー塩基配列をご参照の上ご用意ください。

95℃　1分
↓
94℃　30秒 ┐
55℃　30秒 │ 30 cycles
72℃　3分 ┘
↓
72℃　10分

VI. 実施例

プロトコールに従って、Chicken 由来の polyA^{+} RNA 5 μg を鋳型として、cDNA ライブラリーを作製した。得られたコロニーからランダムに選択したクローン 16 個について、キット添付のベクタープライマーを用いた PCR によりインサート DNA の増幅を行い、1%アガロースゲル電気泳動により確認した。

M1 M2 M2 M1

Lane
M1：λ-*Eco*T14 I digest
M2：pHY Marker

VII. トラブルシューティング

製品の品質管理には万全を期しておりますが、万一実験が正しく行えない場合には、今一度本書の内容をご確認いただき、以下の点についてもご検討ください。

1. Control RNA の利用
   このキットには、control RNA として pSP Tet3 polyA^{+} RNA が含まれておりますので、1st Strand および 2nd Strand cDNA 合成反応が正しく行えるかどうか調べてください。

2. polyA^{+} RNA の純度チェック
   cDNA 合成の効率を最大限に得るためには、インタクトな polyA^{+} RNA ができるだけ高い割合で含まれていることが大切です。純度の悪い RNA サンプルを使用しますと cDNA 合成量や cDNA の伸長、最終的なライブラリーのタイター、インサート長にも影響を及ぼしますので、cDNA 合成反応に用いる前に、260 nm, 280 nm における吸光度の測定や（A_{260}/A_{280} の値が 1.8 ～ 2.1 程度が理想的）、ゲル電気泳動により RNA の純度を調べておくことをお勧めします。

3. RNase の混入
   RNA への RNase の混入を避けるよう細心の注意を払うことが大切です。用いる器具、試薬類はできるだけ乾熱滅菌、オートクレーブを行い、必ずプラスチック手袋を装着して実験を行うようにしてください。

4. エレクトロポレーションによる形質転換
   エレクトロポレーションに用いるライゲーション溶液が多くなると形質転換効率が落ちる場合があります。その場合、最適な形質転換効率が得られる条件を検討し、形質転換を行ってください。

VIII. 補足資料

1. プライマーおよびアダプターの塩基配列

● Oligo (dT)$_{18}$ Anchor Primer

5'- (GA)$_{10}$ CTCGAGCGGCCGC(T)$_{18}$ V-3'（V = A or C or G）

※ 本 Anchor Primer には *Not* I サイトに加えて *Xho* I サイトが付加されています。キット添付の pAP3neo 以外のベクターを使用する場合などに利用可能です。

● *Eco*R I-*Sma* I Adaptor

5'-OH-AATTCCCGGG-3'

GGGCCC p-5'

● T7 promoter primer

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

● T3 promoter primer（for pAP3neo）

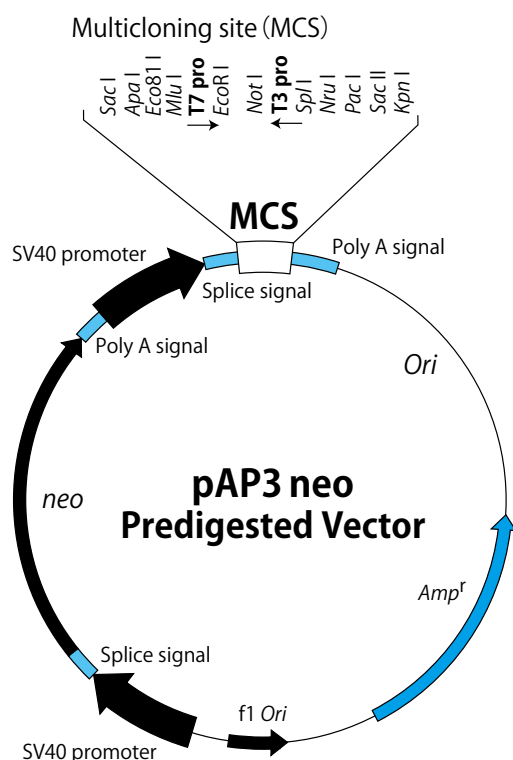
5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'

※ pAP3neo ベクター専用の配列です。

2. pAP3neo ベクターマップ

Multicloning site（MCS）

Sac I
Apa I
*Eco*81 I
Mlu I
T7 pro
*Eco*R I
Not I
T3 pro
Spl I
Nru I
Pac I
Sac II
Kpn I

MCS
SV40 promoter
Poly A signal
Splice signal
Poly A signal
Ori
neo
pAP3 neo
Predigested Vector
Amp^r
Splice signal
f1 *Ori*
SV40 promoter

※ 本キットに含まれる pAP3neo Predigested Vector は、*Eco*R I および *Not* I で切断されています。*Eco*R I 側にはリン酸基が存在しますが、*Not* I 側は脱リン酸処理によりリン酸基が除かれています。

※ 本ベクターの *Eco*R I サイト上流の T7 プロモーターは、*in vitro* transcription 反応に利用できます。

GenBank Accession No.AB 003468

3. 注意事項

Not I 消化の代わりに *Xho* I 消化を行う場合は、V-3. アダプターのライゲーション 1) ～ 3) を行った後、エタノール沈殿により DNA を回収し、制限酵素 *Xho* I（製品コード 1094AH）と添付の H Buffer を用いて 50 μl 系で 37℃, 3 時間程度、消化を行ってください。

IX. ライブラリーの利用方法

IX-1. ライブラリーの増幅

1） 必要クローン数を含むプラスミドライブラリー（ライゲーション溶液）をエレクトロポレーションにて *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells 等へ導入し、タイターを確認する。（エレクトロポレーションについては、V-7. トランスフォーメーション参照）
2） 翌日、φ15 cm LB/Amp プレート（100 μg/ml ampicillin）一枚あたり約 5 万クローン以下となるようプレーティングを行い、37℃で一晩インキュベートする。
3） 生じたプレート上のコロニーに LB/Amp（100 μg/ml ampicillin）を約 2 ml ＊[1] 添加し、スプレッダーおよびピペットで回収する。
4） 再度、LB/Amp（100 μg/ml ampicillin）をプレートに約 2 ml ＊[1] 添加し、再回収を行う。
5） 得られた菌液にグリセロールを 20％となるよう加え、－ 80℃で保存する＊[2]。
6） タイターを確認後、スクリーニングやプラスミド調製などに利用する。

＊ 1：添加した液体培地の多くがプレートへ吸収される場合、添加量を増やしてください。
＊ 2：保存中にタイターが低下する場合があります。タイターを確認後ご使用ください。

IX-2. スクリーニング（コロニーハイブリダイゼーション）用メンブレンの調製

1） 必要クローン数を含むプラスミドライブラリー（ライゲーション溶液）をエレクトロポレーションにて *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells 等へ導入し、タイターを確認する。（エレクトロポレーションについては、V-7. トランスフォーメーション参照）
2） 翌日、φ15 cm LB/Amp プレート（100 μg/ml ampicillin）一枚あたり約 5 万クローン以下となるようプレーティングを行い、37℃で 6 ～ 8 時間インキュベートする。コロニーがお互いに接しない程度まで生育させる。
3） 生じたプレート上のコロニーにナイロンメンブレンをゆっくり接着させ、コロニーをメンブレンに移行させる。この際、後でメンブレンとプレートの位置を照合できるよう針にて穴をあけておく。
4） メンブレンを新しい LB/Amp プレート（100 μg/ml ampicillin）へコロニー面を上にして置き、数時間以上培養することによりコロニーを確実に増殖させる。（マスタープレートは数時間培養後、4℃へ保存する。）
5） 適当な容器にろ紙＊[1] を 2 枚重ね、0.5 N NaOH を染み込ませる。この上にコロニー面を上にしてメンブレンをゆっくり置き、0.5 N NaOH を染み込ませ 30 秒以上アルカリ処理をする。
6） 新しい 2 枚重ねのろ紙＊[1] に 1 M Tris-HCl（pH7.6）を染み込ませる。この上にコロニー面を上にしてメンブレンをゆっくり置き、30 秒以上処理する。
7） 新しい 2 枚重ねのろ紙＊[1] に 1 M Tris-HCl（pH7.6）/1.5 M NaCl を染み込ませる。この上にコロニー面を上にしてメンブレンをゆっくり置き、30 秒以上処理する。
8） 新しい 1 M Tris-HCl（pH7.6）/1.5 M NaCl 中にメンブレンを浸す。手袋をはめ、ゆっくり菌体残渣を洗い流す。
9） 新しい 1 M Tris-HCl（pH7.6）/1.5 M NaCl にて洗浄する。
10） ろ紙にてメンブレンを挟み 80℃、2 時間処理し、DNA をメンブレン上へ固定する。（UV クロスリンカーを使用してもよい。）
11） ろ紙等に挟み埃がかからないようにし、室温にて保存する。
12） 上記操作にて作製したメンブレンをコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングに使用し、目的のクローンを単離することができます。プレハイブリダイゼーション、プローブ調製＊[2]、ハイブリダイゼーション、洗浄、露光・検出に関しては、一般的な手順および使用するラベリングおよび検出試薬などの説明書に従ってください。

＊ 1：コロニー面に液体がかかると、コロニーが流れ落ち良好なシグナル検出ができない場合があるため、メンブレン上部に液体がかからないようにしてください。また、ろ紙とメンブレン間に気泡が入らないよう注意してください。
＊ 2：AlkPhos Direct Labelling and Detection System（GE ヘルスケアバイオサイエンス社製）などを利用できます。

X. 参考文献

1) Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) *Gene*, **25**, 263.
2) 野島博 (1994) 実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ 2「遺伝子ライブラリーの作製法」, p79-94.
3) Wokdnar-Filipowicz, A. *et al*. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2295.
4) Howells, R. D. *et al*. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **81**, 7651.
5) Schneider, C. *et al*. (1984) *Nature*, **311**, 675.
6) Leis, P. *et al*. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 466.
7) Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell Biol*., **2**, 161.
8) Kobori, M., Ikeda, Y., Nara, H., Kato, M., Kumegawa, M., Nojima, H. and Kawashima, H. (1998) *Genes To Cells* **3**, 459-475.

XI. 関連製品

PrimeScript® Reverse Transcriptase（製品コード 2680A/B/C）
Recombinant RNase Inhibitor（製品コード 2313A/B）
DNA Polymerase I（*E. coli*）（製品コード 2130A/B）
T4 DNA Polymerase（製品コード 2040A/B）
T4 DNA Ligase（製品コード 2011A/B）
T4 Polynucleotide Kinase（製品コード 2021S/A/B）
pHY Marker（製品コード 3404A/B）
RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）
NucleoSpin® RNA（製品コード 740955.10/.50/.250）
Oligotex™ -dT30 <Super>（製品コード W9021A/B）
Oligotex™ -dT30 <Super> mRNA Purification Kit（From Total RNA）（製品コード 9086）
Gen とるくん™エタ沈キャリア（製品コード 9094）
E. coli HST08 Premium Electro-Cells（製品コード 9028）
E. coli HST02 Electro-Cells（製品コード 9026）
Stellar™ Electrocompetent Cells（製品コード 636765）
CHROMA SPIN™ -1000+DEPC-H_2O Columns（製品コード 636093/636094）

XII. 注意

- 本製品は、研究用試薬です 。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

組換え大腸菌の取扱いには、適切な処置をとる必要があります。
ご利用の際は、文部科学省が定める省令「研究開発などに関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号および組織内の安全委員会の指示に従ってください。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社